

II. ХРОМОСОМНЫЕ И НЕХРОМОСОМНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ

Д.А.Горденин, В.В.Кваша

ВНУТРИГЕННАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ И МЕТОДЫ ПОСТРОЕНИЯ ГЕННЫХ КАРТ У ГРИБОВ

Кафедра генетики и селекции ЛГУ

В в е д е н и е

В последнее время наши знания о внутригенной рекомбинации у грибов заметно расширились и приобрели более определенный характер. Появилось большое количество работ теоретического характера. Многие авторы пытаются на основании данных генетических экспериментов построить (см., например, Whitehouse, 1963; Holliday, 1964; Stahl, 1968) или модифицировать (Emerson, 1966; Holliday, Whitehouse, 1970; Gutz, 1971; Hotchkiss, 1971) молекулярные модели рекомбинации. Учитывая обилие работ, посвященных молекулярным моделям процесса рекомбинации, мы не будем уделять им внимание в этой статье, а попытаемся рассмотреть некоторые следствия из формально-генетических данных, которые необходимо учитывать при построении вышеупомянутых моделей, и которые существенны для теории методов внутригенного картирования.

Мы будем рассматривать в основном данные, полученные для дрожжей, так как они наиболее изучены в отношении внутригенной рекомбинации. Будем привлекать только те данные по внутригенной рекомбинации у других грибов (нейроспора, аспергилл), которые получены с использованием биохимических маркеров.

Мейотическая внутригенная рекомбинация

Внутригенная рекомбинация — процесс, как правило, нерцепирующий (Case, Giles, 1958; Sherman, Roman, 1963), в основе которого лежит конверсия, открытая К.Линдегренем (Lindegren, 1953). Конверсия была открыта как аномальные расщепления 3A:1a и 1A-3a в тетрадах гетерозиготного гибрида A/a. В дальнейшем было показано, что вновь возникающий мутантный сайт идентичен предшествовавшему и по расположению (Roman, 1958; Case, Giles, 1964) и по нуклеотидному составу (Fogel, Mortimer, 1970).

Конверсионные тетрады встречаются с частотой порядка 1-10% в зависи-

мости от того, какой локус и какая аллель исследуются. Причем частоты конверсии разных мутаций одного гена меняются, как правило, закономерно, уменьшаясь при продвижении от одного конца гена к другому (Lissouba 1962; Murray, 1963; Pees, 1967; Fogel, Hurst, Mortimer, 1971). Эта закономерность называется полярностью частот конверсии. Иногда направление полярности внутри одного гена может быть различным на разных участках (Murray, 1969). На нейроспоре продемонстрировано (Murray, 1968), что направление полярности является функцией самого гена или небольшого участка хромосомы, так как при перенесении исследуемого гена в другие хромосомы направление полярности в нем не изменялось ни при изменении положения относительно центромера, ни при соседстве с геном с противоположной полярностью конверсии.

Современные знания о мейотической конверсии у грибов базируются в основном на работах С.Фогеля, Д.Херста и Р.Мортимера (Fogel, Mortimer, 1969; Fogel, Hurst, Mortimer, 1971; Hurst, Fogel, Mortimer, 1972). Эти авторы исследовали тетрады гибридов, гетерозиготных по многим мутациям в разных генах. Некоторые мутации картировались в одной и той же хромосоме, что давало возможность наблюдать взаимосвязь конверсии некоторых мутаций с реципрокной рекомбинацией фланговых маркеров — мутаций, лежащих по разные стороны от той мутации, конверсия которой исследуется. Уникальным в данных работах является количество проанализированных тетрад (11 000) и то, что в гибридах, гетерозиготных более чем по одной мутации данного гена, производили идентификацию мутантных сайтов данного гена во всех спорах мутантного фенотипа. Последний прием позволил доказать зависимый характер совместной конверсии двух мутаций одного гена. На рис. I изображены классы тетрад в расщеплении гибрида, гетерозиготного по двум мутациям одного гена А, находящимся в транс-положении ($a1/+a2$), получающиеся, если мутации $a1$ и $a2$ конвертируют независимо. Однако в реальных расщеплениях гибридов, гетероаллельных по двум мутациям гена arg_4 , среди 161 конвертантной тетрады не было тетрад классов (μ) и (κ) (рис. I).

Если представить конверсию как перенос информации с одной гомологичной хроматиды на другую, то только классы (μ) и (κ) будут появляться за счет одновременного переноса информации в противоположных направлениях, а все остальные конвертантные тетрады появятся за счет одностороннего переноса информации. Следовательно, эти данные можно считать указанием на то, что существует некий участок конверсии, внутри которого перенос информации идет в одном направлении. Расщепление в 304 тетрадах с конверсией в arg_4 из трех- и четырехсайтовых скрещиваний также удовлетворяли гипотезе конверсии участка. Эту гипотезу поддерживают данные, полученные для нейроспоры (см., например: Stadler, Towe, 1963; Case, Giles, 1964; Stadler, Kariya, 1969).

Одной из существенных черт конверсии участка является ее равнонаправленность. Это значит, что равновероятны оба возможных направления переноса информации в данном участке конверсии, а следовательно, соотношения $3A:1a$ и $1A:3a$ появляются с равной вероятностью. С.Фогель и др. (Fogel, Hurst, Mortimer, 1971) суммировали данные Х.Романа (Roman, 1963) и свои собственные, полученные при тетрадном анализе у дрожжей. Среди 559 конвертантных по разным генам тетрад 278 были типа $3A:1a$ и 281 типа $1A:3a$. Однако равнонаправленность конверсии иногда нарушается. Так, для *Schizosaccharomyces pombe* найден мутант по локусу ade_6 , имеющий в

(H)					
$\frac{a1}{+} \frac{+}{a2}$					
(a)	(б)	(в)	(г)	(д)	(е)
a1 +	a1 +	a1 +	a1 +	a1 +	a1 +
a1 +	a1 a2	+ +	a1 +	a1 +	a1 a2
+ a2	+ +	+ a2	a1 a2	+ +	+ a2
+ a2	+ a2	+ a2	+ a2	+ a2	+ a2
Нормальное расщепление	Реципрокная рекомбинация	Конверсия a1		Конверсия a2	
	(ж)	(з)	(и)	(к)	
	a1 +	a1 +	a1 +	a1 +	
	a1 +	+ a2	+ +	a1 a2	
	a1 +	+ a2	+ +	a1 a2	
	+ a2	+ a2	+ a2	+ a2	
	Конверсия a1 и a2 (в одном направлении)		Конверсия a1 и a2 (в разных направлениях)		

Рис.1. Типы тетрад, ожидаемые в потомстве гетероаллельного гибрида (H) в предположении, что направление конверсии мутаций a1 и a2 независимо. a1 и a2 - мутации гена A.

10 раз большую частоту конверсии, чем остальные мутанты ade_6 и конвертирующий в основном в сторону аллели дикого типа. Интересно отметить, что этот мутант является супер-супрессируемым, а значит, скорее всего произошел за счет замены одной пары оснований (Gutz, 1971 a).

Другая важная черта конверсии участка - равновероятность конверсии с кроссинговером и без кроссинговера по тесно сцепленным фланговым маркерам. Суммирование данных по локусу arg_4 (Hurst, Fogel, Mortimer, 1972) дает 268 конвертантных тетрад с кроссинговером и 281 конвертантную тетраду без кроссинговера, что не отличается достоверно от соотношения 1:1. Если берутся не тесно сцепленные фланговые маркеры (расстояние между маркерами больше 20 морганид), то число рекомбинантных по фланговым маркерам конвертантов увеличивается. Для нейроспоры (Stadler, 1959) и для дрожжей (Fogel, Hurst, 1967) показано, что конверсия без кроссинговера не интерферирует с дополнительным кроссинговером между конвертирующим локусом и фланговым маркером. Эти дополнительные обмены и являются причиной повышенного числа конвертантов рекомбинантных по фланговым маркерам. Вышеуказанное можно суммировать следующим образом. Конверсия участка - это проявление некоторого процесса, который с вероятностью 0,5 приводит к реципрокной рекомбинации точек по краям участка конверсии. Мы присоединяемся к С.Фогелю и др. (Fogel, Hurst, Mortimer, 1971), которые считают этот процесс единственным источником кроссинговера.

Знания о существовании участка конверсии, равнонаправленности конверсии, равновероятности конверсии с кроссинговером и без кроссинговера можно объединить в некую формально-генетическую модель рекомбинации (рис. 2). Опираясь на формально-генетическую модель рекомбинации, Фогель и др. (Fogel, Mortimer, 1969; Fogel, Hurst, Mortimer, 1971) попытались установить приблизительные размеры участка конверсии. Для этого использова-

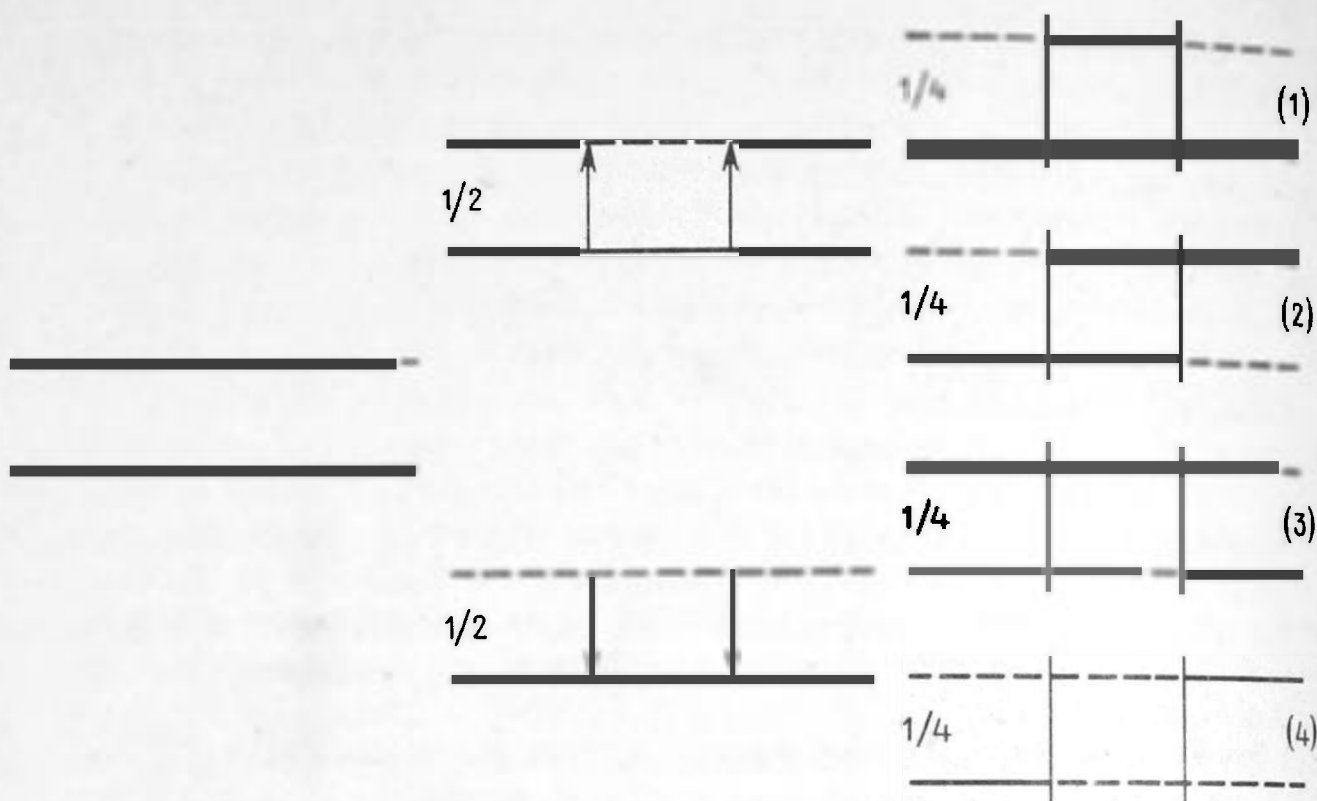


Рис.2. Формально-генетическая модель рекомбинации.

Сплошная и штриховая линии обозначают гомологичные хроматиды; вертикальные линии ограничивают размеры участка конверсии; стрелки указывают направление конверсии. (1) и (3) - конверсия без кроссинговера; (2) и (4) - конверсия с кроссинговером.

ли следствие из модели, которое можно сформулировать так: "Если две мутации внутри одного гена реципрокно рекомбинируют, то участок конверсии расположен между ними и, следовательно, он меньше, чем расстояние между ними. Если две мутации одного гена конвертируют совместно, то участок конверсии захватывает их и по размеру он больше, чем расстояние между ними".

Для измерения участка конверсии использовали расстояния между различными мутациями arg_4 , выраженными в приблизительном количестве нуклеотидных пар. Эти расстояния были получены с помощью "рентгеновского картирования" (с.80). Было установлено, что участок конверсии может иметь длину от 100 до 1000 нуклеотидных пар, поскольку реципрокная рекомбинация близко расположенных аллелей (100 н.п.) и совместная конверсия далеко расположенных аллелей (1000 н.п.) идут довольно редко (5% от всех случаев конверсии участка).

Методы внутригенного картирования, использующие мейотическую рекомбинацию

Наиболее простой метод внутригенного картирования у грибов основан на предположении о том, что частота аскоспор дикого типа в потомстве гибрида, гетероаллельного по двум мутациям одного гена, будет пропорциональна расстоянию между этими мутациями. Это предположение совершенно аналогично предположению, сделанному С.Бензером (Benzer, 1955) при построении одной из первых карт гена. Оно основывается на предположении о том, что

аллели дикого типа в скрещивании $a1+ x + a2$ появляются за счет реципрокной рекомбинации между мутациями $a1$ и $a2$.

В различных работах было показано, что аллели дикого типа гораздо чаще появляются за счет нереципрочных событий (Lissouba e.a., 1962; Case, Giles, 1964; Fogel, Hurst, 1967). Тем не менее карты генов, построенные у грибов с помощью анализа случайной выборки аскоспор, обнаруживают удовлетворительную линейность (Gutz, 1961; Leupold, Gutz, 1965; Griffiths, 1970) и разумное совпадение с картами, построенными с помощью метода фланговых маркеров (Murray, 1963). Все же такие карты содержат внутренние противоречия. Холлидэй (Holliday, 1964) отметил, что наиболее общей и часто встречаемой "болезнью" генных карт, построенных с помощью анализа случайной выборки аскоспор, является "расширение карты" (map expansion). Расширением карты назван тот случай, когда сумма частот прототрофов, полученных при скрещивании соседних мутаций, меньше частоты прототрофов, полученной при скрещивании двух крайних мутаций рассматриваемой группы.

Для того чтобы объяснить относительную линейность генных карт и феномен расширения карты, Фогель и Мортимер (Fogel, Mortimer, 1969) выразили частоту прототрофных аскоспор в скрещивании $a1+ x a2$, на основании формально-генетической модели, как

$$f_{++} = \frac{1}{4} \left(\frac{C_1 + C_2}{2} - C_{1,2} + r_{1,2} \right), \quad (1)$$

где f_{++} - частота встречаемости прототрофных аскоспор; C_1 и C_2 - частоты встречаемости асков с конверсией мутации $a1$ или $a2$, соответственно; $C_{1,2}$ - частота встречаемости асков, конвертантных одновременно и по мутации $a1$, и по мутации $a2$; $r_{1,2}$ - частота встречаемости асков с реципрокной рекомбинацией между мутациями $a1$ и $a2$.

Величина $C_{1,2}$ входит в выражение со знаком (-), так как совместная конверсия не дает прототрофов (классы (ж) и (з) на рис.1).

Согласно формально-генетической модели, чем ближе расположены друг к другу мутации, тем больше величина $C_{1,2}$ и тем меньше величина $r_{1,2}$. Следовательно, величина $(C_{1,2} + r_{1,2})$ будет увеличиваться с расстоянием. Так как C_1 и C_2 от расстояния между мутациями не зависят, то будет наблюдаться тенденция к возрастанию f_{++} при увеличении расстояния между мутациями. Если мутации расположены близко друг к другу, реципрокная рекомбинация отсутствует, а совместная конверсия идет часто. Это, очевидно, и приводит к заниженному значению f_{++} (расширение карты). Источником неклассифицируемых противоречий в данных по случайной выборке аскоспор является, по-видимому, неодинаковость частот конверсии различных мутаций.

Метод фланговых маркеров также основан на анализе случайной выборки аскоспор - потомков гетероаллельного гибрида. Исследуемый гибрид гетерозиготен по фланговым маркерам-мутациям, расположенным справа и слева от исследуемого гена и тесно с ним сцепленным (рис.3). Метод фланговых маркеров был разработан в предположении, что прототрофы в двухсайтовых скрещиваниях появляются за счет реципрокной внутригенной рекомбинации. Согласно современным данным основная масса прототрофов появится за счет единичной конверсии участка между фланговыми маркерами, а именно, в результате конверсии одной из мутаций или в результате конверсии участка между ис-

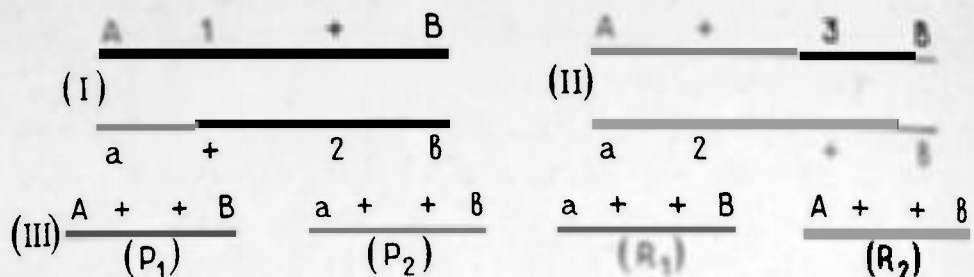


Рис.3. Метод фланговых маркеров (для митотического картирования)

1,2,3 – картируемые мутации; A(a) и B(b) – фланговые маркеры; (I) и (II) – генотипы исследуемых гибридов (альтернативные случаи расположения картируемых мутаций относительно фланговых маркеров); (III) – возможные генотипы прототрофных аскоспор; P_1 и P_2 – родительские сочетания фланговых маркеров; R_1 и R_2 – рекомбинантное сочетание фланговых маркеров.

следуемыми мутациями, которая ведет к их реципрокной рекомбинации.

В таблице показаны генотипы прототрофных спор в каждом из двух альтернативных случаев расположения мутаций относительно фланговых маркеров.

Преимущественные генотипические классы прототрофных аскоспор (метод фланговых маркеров)

Генотип гибрида	Генотип прототрофной споры, появившейся за счет		
	конверсии без кроссинговера	конверсии с кроссинговером	реципрокной рекомбинации между мутациями в гене
$\frac{A \quad 1 \quad + \quad B}{a \quad + \quad 2 \quad b}$ (I) (рис.3)	$\frac{A \quad + \quad + \quad B}{(P_1)}$	$\frac{a \quad + \quad + \quad B}{(R_1)}$	$\frac{a \quad + \quad + \quad B}{(R_1)}$
$\frac{A \quad + \quad 3 \quad B}{a \quad 2 \quad + \quad b}$ (II) (рис.3)	$\frac{A \quad + \quad + \quad B}{(P_1)}$	$\frac{A \quad + \quad + \quad B}{(R_2)}$	$\frac{A \quad + \quad + \quad B}{(R_2)}$

Различие в соотношениях кроссоверных по фланговым маркерам внутренних рекомбинантов может служить основой для установления порядка мутаций в гене. Как видно из данных таблицы, в случае (I) будет появляться преимущественно генотипический класс R_1 , а в случае (II) – класс R_2 . Сам по

Метод фланговых маркеров дает информации только о порядке мутаций. Однако в той же случайной выборке аскоспор можно провести определение частоты возникновения прототрофов для установления расстояния между мутациями. Метод фланговых маркеров применялся для внутригенного картирования только микелиальных грибов — нейроспоры (Standler, 1959; Murray, 1963; Gessor, 1965), аспергилла (Pees, 1967), аскоболюса (Standler e.a., 1970). У дрожжей фланговая система была использована в экспериментах Фогеля и Херста (Fogel, Hurst, 1967). Результаты полностью укладываются в схему, изложенную выше.

Митотическая рекомбинация

Митотическая межгенная рекомбинация у дрожжей происходит при конъюгации гомологичных хромосом в митозе. Митотический межгенный кроссинговер имеет реципрокный характер и сопровождается митотическим расхождением хроматид к противоположным полюсам (Nakai, Mortimer, 1969; Zimmerman, 1973). Митотическая гомозиготизация аллелей, находящихся в гетерозиготе, является доказательством того, что митотический кроссинговер произошел на стадии четырех нитей. Однако недавно было показано (Wildenberg, 1970), что индуцированный рентгеновыми лучами митотический кроссинговер довольно часто (40%) может идти на стадии двух нитей.

Митотическая внутригенная рекомбинация у дрожжей изучается только в селективных системах. Обычно отбирают прототрофные митотические рекомбинанты в потомстве гетероаллельного по исследуемому локусу гибрида. Отсутствие полного анализа всех продуктов внутригенной рекомбинации делает невозможным получение прямого доказательства существования в митозе участка конверсии.

Прототрофы при митотическом делении гетероаллельного гибрида получают почти исключительно за счет нереципрочных событий (конверсии) (Roman, 1956, 1963). Хенаут и Луззати (Henaut, Luzzati, 1972) показали, что среди митотических конвертантов по одному гену митотические конвертанты по гену, расположенному в другой хромосоме, появляются с частотой, равной частоте конверсии по этому гену в мейозе. Самое простое объяснение этого факта заключается в том, что существуют компетентные к митотической конверсии клетки, в которых происходит митотическая конъюгация хромосом. В той же работе показано, что митотический кроссинговер в этих клетках идет с частотой, примерно в 10 раз меньшей, чем в мейозе. Цифры, полученные в других работах (Fogel, Hurst, 1963; Hurst, Fogel, 1964; Wildenberg, 1970), согласуются с данными Хенаута и Луззати. На аналогичность митотической и мейотической рекомбинации указывает и тот факт, что гомозиготные по локусу типа спаривания дрожжи, у которых не может идти мейоз, обладают также пониженной способностью к митотической рекомбинации (Friis, Roman, 1968).

Кроссинговер по фланговым маркерам коррелирует с митотической конверсией, однако частота конверсии с кроссинговером ниже, чем в мейозе. Работы, выполненные с использованием фланговых маркеров (Kakar, 1963; Hurst, Fogel, 1964; Wildenberg, 1970), дают величины 10–20% конверсии с кроссинговером от всех прототрофных конвертантов.

Существует ряд данных, указывающих на некоторую независимость митотической конверсии и кроссинговера. Показано, что ультрафиолетовый свет индуцирует митотическую конверсию гораздо сильнее, чем кроссинговер по фланговым маркерам (Roman, Gascob, 1958; Hurst, Fogel, 1964). Найдены также мутанты, дефектные по индуцированной митотической конверсии, но с нормальной частотой индуцированной митотической рекомбинации (Rodarte - Ramon, 1970).

Переходя к обсуждению методов внутригенного картирования в митозе напомним, что конверсия участка не доказана для митотической рекомбинации, однако результаты, получаемые при внутригенном картировании с использованием митотической рекомбинации, хорошо укладываются в эту гипотезу.

Методы внутригенного картирования, использующие митотическую рекомбинацию

Внутригенное картирование при помощи спонтанной митотической рекомбинации основано на учете частоты прототрофов, возникающих в процессе роста гибрида, гетероаллельного по мутациям в исследуемом гене. Считается, что частота появления прототрофов за вычетом частоты изоаллельных реверсий должна быть пропорциональна расстоянию между мутациями.

Впервые этот метод был применен Притчардом (Pritchard, 1955) для построения карты локуса аденин-9 у *Aspergillus nidulans*. Аналогичный метод был применен П.А. Поповой и др. (1968) для построения карт генов *ade₁* и *ade₂* у дрожжей. Интересно отметить, что в этих исследованиях не наблюдалось закономерного "расширения карты". В наших экспериментах при применении более адекватной методики учета наблюдался противоположный феномен "сужения карты". Сумма частот рекомбинации соседних мутаций превышала частоту рекомбинации двух крайних мутаций.

Увеличение частот появления прототрофных рекомбинантов с увеличением расстояния между мутациями легко объяснить, привлекая гипотезу о конверсии участка. Перепишем выражение (1) для митотической конверсии:

$$f_{++} = \frac{C_1 + C_2}{2} - C_{1,2}, \quad (2)$$

где C_1 , C_2 - частоты конверсии мутаций 1 и 2 в митозе; $C_{1,2}$ - частота совместной конверсии мутаций 1 и 2.

Реципрокная внутригенная рекомбинация в митозе отсутствует, следовательно, $r_{++} = 0$. При увеличении расстояния между мутациями $C_{1,2}$ уменьшается, а значит f_{++} увеличивается. Функция (2) ограничена сверху (так как при увеличении расстояния между мутациями 1 и 2 $C_{1,2} \rightarrow 0$), и, следовательно, на больших расстояниях можно ожидать менее резкого увеличения f_{++} , чем на малых. Это может привести к "сужению карты". Сужение карты обнаружено не только при спонтанной, но и при индуцированной X-лучами митотической рекомбинации (Esposito, 1968).

Метод "рентгеновского картирования" был разработан Мэнни и Мортимером (Manney, Mortimer, 1964). Построение карты производится на основании анализа кривых "доза X-лучей - частота прототрофов - митотических реком-

бинантов, получающихся у облученного гетероаллельного гибрида. Зависимость обычно линейная, а наклон прямой пропорционален расстоянию между мутациями. Этот метод может быть объяснен с помощью представления о конверсии участка, точно так же, как и предыдущий.

Карты, построенные этим методом, менее противоречивы, возможно, из-за того, что индуцированная рекомбинация сглаживает разницу в частотах митотической конверсии разных мутаций и тем самым убирает один из источников отклонений от линейности (см. пояснения к уравнению (1)). Как бы то ни было, сейчас этот метод является наиболее популярным среди генетиков дрожжей (см., например: Fink, 1965; Manney, 1968; Tauro e.a., 1974).

Этот метод был применен для построения карты гена цитохрома (Parker, Sherman, 1969), для которого известна первичная структура контролируемого им белка. Таким образом, частоты индуцированной рекомбинации приведены в соответствие с физическим расстоянием между мутациями.

Показано, что митотическая конверсия и митотический кроссинговер индуцируются химическими агентами (Zimmerman, Schwaier, 1967; Zimmerman, von Laer, 1967). Сноу и Корш (Snow, Korsch, 1970) показали, что метилметансульфонат (ММС) может с успехом заменять рентгеновы лучи при внутригенном картировании в митозе. Зависимость частоты рекомбинантов от дозы ММС прямолинейная, а наклон прямой пропорционален расстоянию между мутациями.

Весомым возражением против внутригенного картирования с помощью митотической рекомбинации, как спонтанной, так и индуцированной, является сильная модификация ее учитываемой частоты генотипическим фоном. Как пример, можно привести данные Мэнни (Manney, 1964), который построил кривые "рентгеновского картирования" для диплоидов, гетероаллельных по одной и той же паре мутаций, но полученных из разных гаплоидных штаммов. Без облучения и при облучении частота митотической рекомбинации сильно варьировала от диплоида к диплоиду.

Этим же автором предложен остроумный прием для устранения неоднородности генотипического фона при "рентгеновском картировании" у дрожжей и других грибов, у которых возможен рост гаплоидных клеток - родителей будущего гибрида. Для дрожжей этот прием заключается в получении мутаций по исследуемому гену на двух штаммах противоположного типа спаривания (так называемые "музеи-а" и "музеи α "). Далее проводятся скрещивания только между штаммами из музеев "а" и " α ", так что все гетероаллельные диплоиды имеют одинаковый генотипический фон.

Очевидно, что в этом случае многие комбинации мутаций не могут быть проанализированы и матрица скрещиваний будет неполной. Для этого случая С.Г. Инге-Вечтомовым и др. (1974) разработан метод анализа, позволяющий выбрать наиболее вероятный порядок мутаций.

Метод фланговых маркеров для картирования в митозе не применялся, однако, нам кажется, что фланговые системы могут быть полезны при митотическом картировании.

Для митотического картирования этим способом необходим один фланговый маркер, расположенный дистальнее от центромера по отношению к изучаемому гену (рис. 4). Картирование двух мутаций сводится к отбору рекомби-

нантов дикого типа по исследуемому гену и определению частоты встречаемости среди них гомозигот по рецессивной аллели флангового маркера А. Для

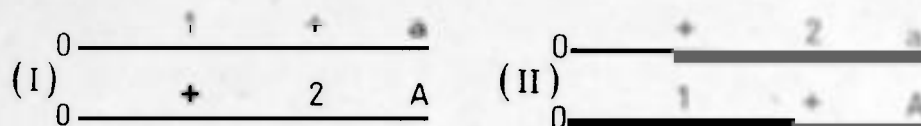


Рис.4. Метод фланговых маркеров для внутригенного картирования с помощью митотической рекомбинации.

(I) и (II) - гибриды с реципрокным сочетанием картируемых мутаций (1 и 2) и флангового маркера (А и а); 0 - центромер.

каждой пары мутаций необходимо анализировать два диплоида (I и II на рис. 4), реципрокные по сочетанию картируемых мутаций с аллелями флангового маркера. Рассуждения, аналогичные примененным для метода фланговых маркеров в мейозе, приводят нас к следующему заключению. Рецессивные гомозиготы по фланговому маркеру будут встречаться чаще среди митотических конвертантов того гибрида, в котором рецессивная аллель флангового маркера находится в одной хромосоме с мутацией, ближней к центромеру (гибрид I на рис. 4). Подобные реципрокные скрещивания были проделаны для двух пар аллелей гена *ile₁* у дрожжей и позволили определить расположение этих аллелей (Kakar, 1963). Нам кажется, что предлагаемый метод может быть полезен для картирования генов, дикий тип по которым не имеет селективного преимущества над мутантами, что не позволяет провести количественный учет частоты рекомбинаций.

Метод трехсайтовых скрещиваний. Все описанные выше методы внутригенного картирования требуют попарного скрещивания большей части картируемых мутаций, а также количественного учета результатов. Это делает их непригодными для картирования большого количества (сотен) мутаций. Однако такая потребность нередко возникает при изучении мутационных систем. Очевидно, для быстрого и хотя бы приблизительного картирования многих мутаций необходимы качественные методы.

Наиболее удобным качественным методом является метод перекрывающихся делеций, разработанный впервые для бактериофага T4 (Benzer, 1955), однако у дрожжей делеции были практически недоступны до последнего времени.

Аналогичный бензеровскому тест может быть разработан с использованием двойных мутантов по одному локусу. Рассмотрим диплоид, содержащий аллель с двумя мутациями в исследуемом гене, и аллель, содержащую одну мутацию. Очевидно, что возможны два качественно отличимых друг от друга расположения этих мутаций (рис.5). В случае (а) прототрофы будут получаться только тогда, когда участок конверсии попадет между мутациями 1 и 2,

что будет происходить очень редко. В случае (δ) прототрофы будут получать-
ся и за счет конверсии мутации 4. Очевидно, что в этом случае частота
прототрофов будет гораздо выше и будет сравнима с частотой, получаемой в
двухсайтовом скрещивании.

Неравенство частот прототрофов в этих двух случаях было впервые про-
демонстрировано Мэнни и Мортимером (Manney, Mortimer, 1964). Двойные
мутанты для внутригенного картирования применил впервые Финк (Fink,
1965).

С.Г.Инге-Вечтомовым и др. (Инге-Вечтомов, Горденин, Кваша, 1975) по-

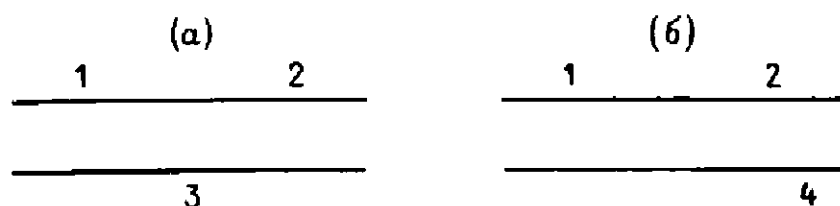


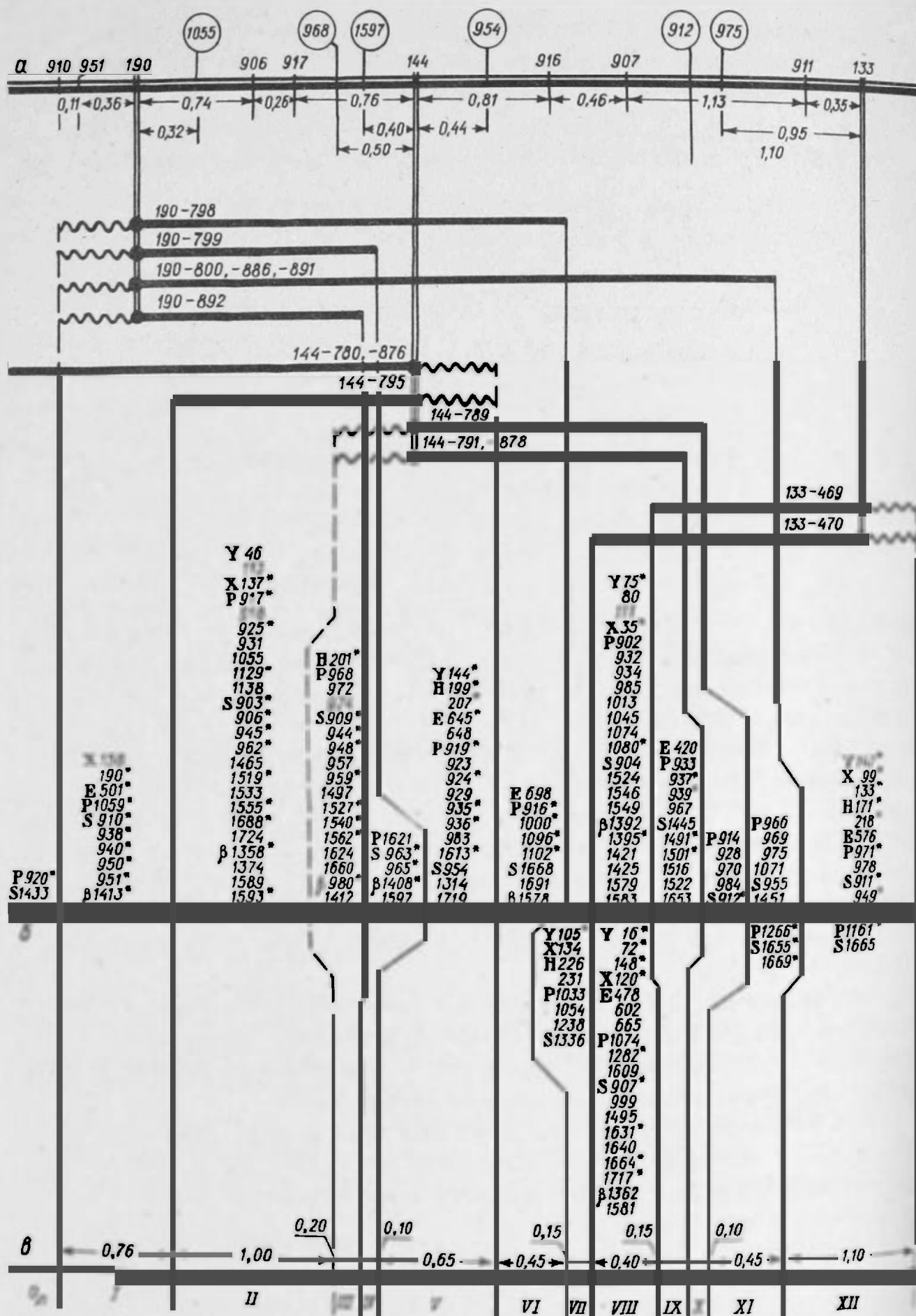
Рис.5. Различное положение трех мутаций
в одном гене.

1, 2, 3, 4 - мутации.

лучена коллекция двойных мутантов по локусу ade_2 у дрожжей. Двой-
ные мутанты получали как мутации супрессируемой нонсенс-аллели
 ade_2 в несупрессируемую. В результате исследования митотической
рекомбинации в скрещиваниях двойных мутантов между собой и с
одиночными мутациями была построена карта маркированных участков
локуса ade_2 , расположенных между двумя мутантными сайтами двой-
ного мутанта, что позволило разбить ген ade_2 на 12 контролируемых отрез-
ков, образующих контролируемую область гена ade_2 . В дальнейшем мы исполь-
зовали двойные мутанты для картирования коллекции 177 некомплементирующих
и полярно комплементирующих мутаций ade_2 в качественном тесте митотичес-
кой рекомбинации (см. рис.5 и пояснения в тексте). Результаты этой работы
приведены на рис.6.

В ходе работы было установлено, что рекомбинационная длина маркиро-
ванных участков двойных мутантов больше их физической длины. На рис.6 это
увеличение со стороны фиксированного конца маркированного участка (исход-
ной мутации ade_2) изображено волнистой линией.

Сто шестьдесят шесть из ста семидесяти семи мутаций ade_2 оказались
расположены в контролируемой области гена. Это говорит о том, что с по-
мощью имеющегося набора двойных мутантов можно успешно картировать боль-
шое количество мутаций ade_2 .



З а к л ю ч е н и е

Несмотря на то, что предпосылки, использованные для разработки методов внутригенного картирования, оказались не совсем верными, эти методы могут давать верные результаты. Однако методы внутригенного картирования, использованные до настоящего времени, были весьма трудоемки и не всегда давали однозначные результаты. Гораздо более перспективными являются простые качественные методы, например метод трехсайтовых скрещиваний и метод перекрывающихся делеций. Выбор одного из этих двух методов зависит от того, что легче может быть получено — делеции или двойные мутанты. Необходимость же разработки качественных методов кажется нам несомненной.

З и м м а р у

The data from tetrad analysis and mitotic recombination are reviewed to construct a formal genetic theory of intragenic recombination. This formal genetic model is consistent with all methods of intragenic mapping developed now. Most of all it can provide some new methods such as the method which is using flanking marker in mitosis and express mapping with double mutants.

У к а з а т е л ь л и т е р а т у р ы

- Инге-Вечтомов С.Г., Попова И.А., Гукровский Д.И. и др. Рекомбинация и комплементация в локусе *ade₂* у дрожжей. — В кн.: Исследования по генетике. Вып.5. Л., 1974, с.35-48.
- Инге-Вечтомов С.Г., Горденин Д.А., Кваша В.В. Двойные мутанты по локусу *ade₂* у дрожжей *S. cerevisiae* и их использование для внутригенного картирования. — "Генетика", 1975, № 4, с.121-133.

Рис.6. Картирование мутаций в гене *ade₂* с помощью двойных мутантов.

Линии (α) и (δ) — ген *ade₂*. Над линией (α) — мутации, картированные в количественном тесте митотической рекомбинации. Отрезки под линией (α) — маркированные участки двойных мутантов. Проекция концов маркированных участков на изображение гена *ade₂* (линия (δ)) дает ряд контролируемых участков. Над линией (δ) — длины контролируемых участков, под линией (δ) — их номера. (δ) — распределение одиночных мутаций по контролируемым участкам с помощью качественного теста митотической рекомбинации. Звездочкой обозначены мутации-нонсенсы. В каждом контролируемом участке мутации, полученные под действием одного мутагена, расположены в столбце рядом. Слева от первой из мутаций, полученной под действием данного мутагена, стоит его символ: Р — радиоактивный изотоп фосфора — P^{32} ; S — радиоактивный изотоп серы — S^{35} ; β — β -лучи; X — рентгеновы лучи; Y — ультрафиолетовый свет; H — азотистая кислота; E — этилметансульфонат. Остальные пояснения см. в тексте.

- Попова И.А., Райпулис Е.П., Инге-Вечтомов С.Г.
Использование спонтанной митотической рекомбинации для анализа тон-
кой структуры локуса *ade₁* у дрожжей *S.cerevisiae*. - "Генетика",
1968, № II, с.116-122.
- B e n z e r S. Fine structure of genetic region in bacteriophage. -
"Proc. Nat. Acad. Sci. USA", 1955, vol.41, p.344-354.
- C a s e M.E., G i l e s N.H. Evidence from tetrad analysis for both
normal and aberrant recombination between allelic mutants in
N.crassa. - "Proc. Nat. Acad. Sci. USA", 1958, vol.44, p.378-390.
- C a s e M.E., G i l e s N.H. Allelic recombination in *Neurospora*.
Tetrad analysis of a three point cross within the *pan-2* locus. -
"Genetics", 1964, vol.49, p.529-540.
- E m e r s o n S. Quahitative implication of the DNA repair model of ge-
ne conversion. - "Genetics", 1966, vol.53, p.475-485.
- E s p o s i t o R.E. Genetic recombination in sinchronized cultures of
Saccharomyces cerevisiae. - "Genetic", 1968, vol.59, p.191-210.
- F i n k G.R. A cluster of genes controlling three enzymes in histidine
biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. - "Genetics", 1965, vol.53,
p.445-459.
- F o g e l S., H u r s t D.D. Coincidence relations between mitotic ge-
ne conversion and mitotic recombination in *Saccharomyces*. - "Gene-
tics", 1963, vol.48, p.321-328.
- F o g e l S., H u r s t D.D. Meiotic gene conversion in yeast tetrads
and the theory of recombination. - "Genetics", 1967, vol.57, p.455-
481.
- F o g e l S., H u r s t D.D., M o r t i m e r R.K. Gene conversion
in unselected tetrads from multipoint crosses. - "Stadler Simp I",
1971, vol.2, p.89-110.
- F o g e l S., M o r t i m e r R.K. Information transfer in gene con-
version. - "Proc. Nat. Acad. Sci. USA", 1969, vol.62, p.96-103.
- F o g e l S., M o r t i m e r R.K. Fidelity of meiotic gene conver-
sion in yeast. - "Mol. Gen. Genet", 1970, vol.109, p.177-185.
- F o g e l S., M o r t i m e r R.K. Recombination in yeast. - "Ann.
Rev. Genet.", 1971, vol.5, p.219-236.
- F r i i s J., R o m a n H. The effect of the mating type alleles on
intragenic recombination in yeast. - "Genetics", 1968, vol.59, p.33-
36.
- G e s s o p A.P., C a t c h e s i d e D.G. Interallelic recombination
at the *his I* locus in *N.crassa* and its genetic control. - "Heredi-
ty", 1965, vol.20, p.237-256.
- G r i f f i t h s A.F.G. Topography of the *ad-3* region of *N.crassa*. -
"Can. J. of Genet.", 1970, vol.12, p.420-424.
- G u t z H. Distribution of X-ray and nitrous acid induced mutations in
the genetic fine structure map of the *ade 7* locus of *Schizosaccharo-
myces pombe*. - "Nature", 1961, vol.191, p.1125-1126.
- G u t z H. Gene conversion remarks on the quantitative of hibrid DNA mo-
dels. - "Genet. Res.", 1971, vol.17, p.45-60.
- G u t z H. Site speciphic induction of gene conversion in *Sch. pombe*. -
"Genetics", 1971a, vol.69, p.317-329.

- Benaut A., Luzzati M. Control of recombination ability of vegetative cells in *S.cerevisiae*. - "Mol. Gen. Genet.", 1972, vol.116, p.26-33.
- Holliday R. A mechanism of gene conversion in fungi. - "Genet. Res.", 1964, vol.5, p.282-304.
- Holliday R., Whitehouse H.L.K. The wrong way to think about gene conversion? - "Mol. Gen. Genet.", 1970, vol.107, p.85-93.
- Hotchkiss K.D. Toward a general theory of genetic recombination in DNA. - "Adv. in Genet. USA", 1971, vol.16, p.325-348.
- Hurst D.D., Fogel S. Mitotic recombination and heteroallelic repair in *S.cerevisiae*. - "Genetics", 1964, vol.50, p.435-458.
- Hurst D.D., Fogel S., Mortimer R.K. Conversion associated recombination in yeast. - "Proc. Nat. Acad. Sci. USA", 1972, vol.69, p.101-105.
- Kakar S.N. Allelic recombination and its relation to recombination of outside markers in yeasts. - "Genetics", 1963, vol.48, p.957-966.
- Leupold U., Gutz H. Genetic fine structure in *Schizosaccharomyces pombe*. - Proc. 11th Intern. Congr. Genet., 1965, vol.2, p.31-35.
- Lindgren C.C. Gene conversion in *Saccharomyces*. - "J. Genet.", 1953, vol.51, p.625-637.
- Lissouba P., Mousseau G., Rizet G. e.a. Fine structure of genes in the ascomycete *Ascobolus immersus*. - "Advanc. Genet.", 1962, vol.II, p.343-380.
- Manney T.R., Ph.D.Thesis, University of California, Berkley, 1964, 138 p.
- Manney T.R. Evidence for chain termination by super-suppressible mutants in yeasts. - "Genetics", 1968, vol.60, p.719-793.
- Manney T.R., Mortimer R.K. Allelic mapping in yeast by X-ray induced mitotic reversion. - "Science", 1964, vol.143, p.581-583.
- Murray N.E. Polarized recombination and fine structure within me-2 gene of *N.crassa*. - "Genetics", 1963, vol.48, p.1163-1183.
- Murray N.E. Polarized intragenic recombination in chromosome rearrangement of *neurospora*. - "Genetics", 1968, vol.58, p.181-191.
- Murray N.E. Reversal of polarized recombination of allelic as a function of their position. - "Genetics", 1969, vol.61, p.66-77.
- Nakai S., Mortimer R.K. Studies of genetic mechanism of radiation induced mitotic segregation in yeasts. - "Mol. Gen. Genet.", 1969, vol.103, p.329-338.
- Parker J.H., Sherman F. Fine structure mapping and mutational studies of genes controlling yeasts cytochrome c. - "Genetics", 1969, vol.62, p.9-22.
- Pees E. Genetic fine structure and polarized negative interference at Lys 51 (FL) locus of *aspergillus nidulans*. - "Genetics", 1967, vol.38, p.275-404.
- Pritchard R.H. The linear arrangement of series of allelic of *Aspergillus nidulans*. - "Heredity", 1955, vol.9, p.343-371.
- Rodarte - Ramon U.S. Isolation and characterisation of recombination deficient mutants in *S.cerevisiae*. Ph.D.Thesis. Univ.California, Berkley, 1970, (Fogel, Mortimer, 1971.)

- R o m a n H. Studies on gene mutation in *Saccharomyces*. - "Cold Spring Harb. Simp.", 1956, vol.21, p.175-183.
- R o m a n H. Sur les recombinaisons non-reciproques chez *Saccharomyces cerevisiae* et sur les problèmes posés par ces phénomènes. - "Ann. Genet.", 1958, vol.1, p.11-17.
- R o m a n H. Genic conversion in *Fur*. - In: Methodology in Basic genetics. San-Francisco, 1963, p.209-227.
- R o m a n H., G a c o b F. A comparison of spontaneous and ultraviolet induced allelic recombination with reference to the recombination of outside markers. - "Cold. Spring. Harb. Simp.", 1958, vol.23, p.155-159.
- S h e r m a n F., R o m a n H. Evidence for two types of allelic recombination in yeasts. - "Genetics", 1963, vol.48, p.255-261.
- S n o w R., K o r s c h C.T. Alkilation induced gene conversion in yeasts: use in fine structure mapping. - "Mol. Gen. Genet.", 1970, vol.107, p.201-208.
- S t a d l e r D. The relationship of gene conversion to crossing-over in *Neurospora*. - "Proc. Nat. Acad. Sci. USA", 1959, vol.45, p.1625-1629.
- S t a d l e r D., K a r i y a B. Intragenic recombination at the *mtr* locus of *Neurospora* with segregation at an unselected site. - "Genetics", 1969, vol.63, p.291-316.
- S t a d l e r D., T o w e A.M. Recombination of allelic cysteine mutants in *Neurospora*. - "Genetics", 1963, vol.48, p.1324-1344.
- S t a d l e r D., T o w e A.M., R o s s i g n o l J.-L. Intragenic recombination of ascospore color mutants in *Ascobolus* and its relationship to the segregation of outside markers. - "Genetics", 1970, vol.66, p.423-438.
- S t a h l F. One way to think about gene conversion. - "Genetics", 1968, vol.61, suppl.i, p.1-13.
- T a u r o P., H o l z n e r U., C a s t o r p h H., H i l l F., S c h w i e z e r E. Genetic analysis of noncomplementing fatty acid synthetase mutants in *S.cerevisiae*. - "Molec. Gen. Genet.", 1974, vol.129, p.131-148.
- W h i t e h o u s e H.L.K. A theory of crossing - over by means of hybrid deoxyribonucleic acid. - "Nature", 1963, vol.199, p.1034-1040.
- W i l d e n b e r g J. The relationship of mitotic recombination to DNA replication in yeasts pedigrees. - "Genetics", 1970, vol.66, p.291-304.
- Z i m m e r m a n F.K. A yeast strain for visual screening for the two reciprocal products of mitotic crossing over. - "Mutat. Res.", 1973, vol.21, p.263-269.
- Z i m m e r m a n F.K., L a e r U. von. Induction of mitotic recombination with ethylenimine in *S.cerevisiae*. - "Mut.res.", 1967, vol.4, p.377-379.
- Z i m m e r m a n F.K., S c h w a i e r R. Induction of mitotic gene conversion with nitrous acid. 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanine and other alkylating agents in *S.cerevisiae*. - "Molec. Gen. Genet.", 1967, vol.100, p.63-76.